Über die Pilzstärke (Amylose) bei Aspergillus niger v. Tgh.

und einige Bemerkungen über ihren diastatischen Abbau

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Georgia-Augusta-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dorothea Schmidt
aus Freiburg i. B.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer in Berlin
1925

Tag der mündlichen Prüfung: 4. März 1925

Referent: Herr Professor Dr. A. Rippel

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Arbeit erscheint gleichzeitig in der Biochemischen Zeitschrift Bd. 158, S. 223—252, 1925

Über die Pilzstärke (Amylose) bei Aspergillus niger v. Tgh. und einige Bemerkungen über ihren diastatischen Abbau.

Von

Dorothea Schmidt.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Einleitung 223
II. Physiologie der Pilzstärke 224
III. Chemie der Pilzstärke 239
IV. Diastatische Spaltung der Amylose 247

I. Einleitung.

In verschiedenen Pilzen und Bakterien sind Polysaccharide gefunden worden, die sich mit Jod blau färben können. In einigen Fällen sind es ausgesprochene Reservestoffe, in anderen ist ihre physiologische Bedeutung noch umstritten. Über ihre chemische Zusammensetzung ist sehr wenig bekannt. Bei folgenden Arten ist eine solche Substanz nachgewiesen worden:

Boletus pachypus[1]), Dematium[2]), Aspergillus niger[2]), Aspergillus oryzae[2]), Aspergillus fumigatus[2]), Aspergillus glaucus[2]), Penicillium, mehrere Arten[2]), Citromyces[2]), Beggiatoa mirabilis[3]), Thiosphaerella amylifera[3]), Spirillum amyliferum[4]), Bacillus amylobacter[5]), Bacillus esterificans[6]), Pseudomonas trifolii[6]), Bacterium coli[7]), Bacterium xylinum, Bacterium pasteurianum, Bacterium kützingianum[8]); (bei diesen letzten drei Arten handelt es sich um Hemicellulosen, die in der Zellwand und im

---

[1]) *Bourquelot* 1891, siehe *J. Zellner*, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

[2]) *Lindner*, *Tanret*, *Wehmer*, *Boas*, siehe *F. Boas*, Beih. z. Botan. Centralbl., Abt. I, **36**, 135, 1919.

[3]) Nach *A. Janke*, Allgem. Techn. Mikrobiologie. Dresden und Leipzig 1924.

[4]) *van Tieghem*, Bull. Soc. botan. de Fr. **26**, 65, 1879.

[5]) Unter anderen *G. Bredemann*, Centralbl. f. Bakt., II, **23**, 385, 1909.

[6]) *H. Huss*, ebendaselbst, II, **19**, 50, 1907.

[7]) *E. Ch. Grey*, Biochem. Journ. **18**, 712, 1924.

[8]) *Hansen*, Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet **3**, 1894.

Schleim vorkommen). Auch eine von verschimmeltem Brot isolierte Rhizopusart konnte ich durch geeignete Ernährungsbedingungen (20 Proz. Saccharose, 0,5 Proz. NH_4NO_3, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$) zur Bildung eines solchen Stoffes veranlassen. Es ist anzunehmen, daß die Fähigkeit dazu noch weiter verbreitet ist. Auf den Zusammenhang der bei den Pilzen gefundenen Substanz mit dem Isolichenin der Flechten werde ich noch später eingehen.

In den letzten Jahren haben *F. Boas*[1]) und *H. Lappalainen*[2]) ausführlich über diesen Gegenstand gearbeitet. Der Versuchspilz war bei *H. Lappalainen* immer, bei *F. Boas* meistens Aspergillus niger *van Tieghem*. Bei beiden findet sich eine Zusammenstellung der älteren Literatur darüber. Die wichtigsten Ergebnisse von *Boas* sind diese: Die Substanz ist in der Zellmembran und in der Nährlösung nachzuweisen. Sie färbt sich wie Stärke in der Kälte blau, in der Wärme nicht mit Jod; nach Behandlung mit Diastase oder kochender verdünnter Säure unterbleibt diese Reaktion, und *Fehlings*che Lösung wird reduziert; in Kalilauge quillt die Substanz auf, die Jodreaktion aber ist auch nach Kochen mit KOH unverändert. $[\alpha]_D = +120$ bis 160^0. Sie ist in Wasser leicht löslich und wird durch Alkohol ausgefällt. Sie entsteht nur als ein pathologisches Produkt bei starker Azidität der Nährlösung, was auf Säurelähmung der Pilzdiastase beruhen soll, und soll abgebaut werden, sobald durch Abnahme der Azidität die Diastase wieder wirksam wird. Zu ihrem Aufbau können ganz verschiedene Zucker, mehrwertige Alkohole und organische Säuren als Kohlenstoffquelle Verwendung finden, am günstigsten aber ist Saccharose. Die Sonderstellung der Saccharose soll mit besonders geringer Diastasebildung beim Wachstum auf diesem Zucker zusammenhängen.

H. Lappalainen stellte fest, daß die Pilzstärke[3]) zuerst in der Membran gebildet, dann zum Teil in die Nährlösung abgegeben wird; das soll unter günstigen Wachstumsbedingungen normalerweise eintreten. Die Substanz soll die Funktion eines Membranstoffs und gleichzeitig eines Reservestoffs ausüben. Die Verfasserin bestätigt die besonders günstige Wirkung der Saccharose auf die Pilzstärkebildung und bringt eine Reihe von Beobachtungen über den Einfluß der Temperatur und der Konzentration der Nährstoffe, auf die ich später eingehen werde.

II. Physiologie der Pilzstärke.

Qualität der Kohlenstoffquelle. Auch ich habe ausschließlich mit Aspergillus niger gearbeitet. Meine erste Aufgabe war die weitere Aufklärung der Bedingungen für die Entstehung der Pilzstärke. Die zunächst liegende Frage war: Ist die günstige Wirkung der Saccharose auf eine Synthese des Polysaccharids direkt aus diesem Disaccharid zurückzuführen, oder ist die Wirkung indirekt? Letztere Annahme

---

[1]) *F. Boas*, diese Zeitschr. **78**, 308, 1917; **81**, 80, 1917; Ber. d. deutsch. botan. Ges. **37**, 50, 1919; Beih. z. Botan. Centralbl., Abt. I, **36**, 135, 1919; Centralbl. f. Bakt. II, **56**, 7, 1922.

[2]) *H. Lappalainen*, Biochemische Studien an Aspergillus niger. Helsingfors 1919.

[3]) Ich wähle diesen Trivialnamen im Anschluß an *Lappalainen*, da der Ausdruck „lösliche Stärke", den *Boas* gebraucht, im allgemeinen ein anderes Produkt bezeichnet, das nicht mit Pilzstärke identisch ist.

erwies sich als richtig, und zwar kommt die Förderung in erster Linie darum zustande, weil aus diesem Zucker besonders viel Säure gebildet wird[1]). Wie schon *Boas* zeigte, ist Rohrzucker in seiner Wirkung auf die Pilzstärkebildung nicht durch Invertzucker zu ersetzen. Auch der Säuregrad ist größer bei Kulturen, die auf Saccharose gewachsen sind, als bei solchen auf einem Gemisch von Glucose und Fructose in äquivalenter Menge; das geht sowohl aus meinen (unten mitgeteilten) Versuchen hervor wie aus denen von *M. Molliard*[2]), von denen ich erst nachträglich Kenntnis erhielt. *Molliard* führt diese Erscheinung auf die dem Rohrzucker beigemengten Verunreinigungen zurück; über deren chemische Natur sagt er nichts aus, so daß der Zusammenhang mit der Säurebildung unklar bleibt. Mir scheint die Annahme näher zu liegen, daß der unbeständige Sauerstoffring im Fructoseanteil der Saccharose[3]) dafür ausschlaggebend ist, der ja dieses Disaccharid auch sonst besonders reaktionsfähig macht. Ich möchte diesen Vorgang der Säurebildung in Parallele setzen zu der Bildung von Acetaldehyd[4]) im Gewebebrei, der nach *Neuberg* und *Gottschalk* aus Glykogen drei- bis fünfmal so stark ist wie aus Glucose, was *Kuhn*[5]) auf die verschiedenartige Lage der Sauerstoffringe in den beiden Verbindungen zurückführt.

Bei den folgenden Versuchen wurde nur die potentielle, nicht die aktuelle Säure bestimmt; diese Messung genügt, da es sich meist um starke Säuren handelte, und da es ja nur auf Vergleichswerte, nicht auf eine absolute Ermittlung der $H^{\cdot}$-Konzentration ankam. Als Indikator wurde Phenolphthalein gewählt, dessen Farbumschlag nicht wesentlich durch den vom Pilz produzierten gelben Farbstoff gestört wird. Die Jodreaktion wurde immer makroskopisch an einem mit der Platinnadel entnommenen Stück Mycel auf einem Uhrglase mit n/100 Jodlösung geprüft. Sie tritt nicht immer momentan ein; wahrscheinlich tut sie es nur, wenn die Pilzstärke sich auf der Außenfläche der Zellwand befindet.

Versuch: Vier Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben von je 300 ccm Inhalt mit 50 ccm Nährlösung angesetzt, die 0,5 Proz. NH_4NO_3, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$ in destilliertem Wasser aufgelöst[6]) enthielt. Außerdem bekamen zwei der Kolben 5,7 Proz. Saccharose, die beiden anderen in äquivalenter (auf Invertzucker berechneter) Menge — je 3 Proz. — Glucose und Fructose. Temperatur 30°. Ein Paar Kulturen wurde 3 Tage, das andere 5 Tage nach der Impfung geerntet.

---

[1]) Außerdem vielleicht durch geringere Diastasebildung (Boas).
[2]) *M. Molliard*, C. r. **178**, 161, 1924.
[3]) Vgl. *M. Bergmann*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **56**, 1227, 1923.
[4]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164, 1924.
[5]) *R. Kuhn*, ebendaselbst **57**, 1965, 1924.
[6]) Soweit nichts anderes bemerkt ist, wurden die Mineralsalze immer in dieser von *H. Lappalainen* angegebenen Mischung angewandt.

	Mycelentwicklung	Jodfärbung	10 ccm Nährlösung neutralisieren von n/30 NaOH ccm
3 Tage auf Saccharose	stark faltig, fest	stark blau	21,6
3 Tage auf Glucose + Fructose	schwach und weich	braun, Spuren blau	8,1
5 Tage auf Saccharose	bei beiden ziemlich gleichmäßig stark, faltig und fest	schmutzigblau	17,2
5 Tage auf Glucose + Fructose		braun	14,2

Die stärkere Säurebildung auf Saccharose tritt klar hervor, wenn auch bei der 5 Tage alten Kultur nicht so scharf wie bei der 3 Tage alten; vielleicht hat bei dieser schon der Rückgang der Azidität eingesetzt. Die größere Anhäufung von Pilzstärke in den Saccharosekulturen ist auch zu erkennen. Bewiesen wird die ausschlaggebende Bedeutung der Säurebildung aber erst durch das Ergebnis, das ich bei Säurezusatz erhielt:

Vier Kolben wurden vor der Sterilisation genau so beschickt wie im ersten Versuch, nachher aber bekamen sie je 0,4 ccm einer annähernd 10 n Schwefelsäure. Temperatur 30°.

	Mycelentwicklung	Jodfärbung
4 Tage auf Saccharose	kaum gekeimt	—
4 Tage auf Glucose + Fructose	schwach gewachsen, einzelne Inseln	Oberseite stark und rein blau
9 Tage auf Saccharose	nur eine der beiden Kulturen schwach gewachsen, eine kleine Insel	blau
9 Tage auf Glucose + Fructose	fast lückenlos über die ganze Oberfläche hin gewachsen	blauschwarz, Unterseite tiefer als bei der Saccharosekultur

Bei diesem starken Säurezusatz sind also die auf Glucose + Fructose gewachsenen reicher an Pilzstärke als die auf Saccharose gewachsenen Kulturen. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der bei Saccharose eingetretenen Wachstumshemmung, die ja in der Tabelle deutlich zum Ausdruck kommt. Das Säuremaximum ist offenbar abhängig von der Art der Kohlenstoffquelle.

Versuch: Vier Kulturen wurden angesetzt auf 5 Proz. Glucose, Fructose, Lactose bzw. Glycerin, mit so viel H_2SO_4-Zusatz, daß die Nährlösung 0,12 säurenormal ist; die übrigen Bedingungen wie oben.

	Mycel am dritten Tage	Mycel am sechsten Tage	Jodfärbung am sechsten Tage
Glucose	am besten gewachsen, Inseln mit scharfem, wulstigem Rand	große Masse, stark faltig, einzelne Konidien	stark blau
Fructose	Inseln mit weniger scharfem Rand	etwas weniger Masse, faltig, keine Konidien	stark blau
Lactose	Inseln mit verschwommenem Rand	durchsichtig dünn, schleimig	braun
Glycerin	eben gekeimt	einzelne kleine, stark gewölbte Inseln	stark blau

Die braune Jodreaktion der Lactosekultur hängt mit ihrer weichen, schleimigen Beschaffenheit zusammen; Lactose ist ja bekanntlich für Aspergillus nicht oder nur (in saurer Lösung) schwer angreifbar. Nicht nur der Pilzstärkegehalt der Nährlösung, wie schon *H. Lappalainen* feststellte, sondern auch der des Mycels selbst tritt fast nur mit dessen starker, welliger Ausbildung zusammen auf.

Qualität und Quantität der Stickstoffquelle. Solche dünnen, weichen, pilzstärkefreien Kulturen erhält man oft, wenn man Pepton als einzige oder auch neben einer anderen Kohlenstoffquelle gibt; schon 1 Proz. Pepton neben 10 Proz. Rohrzucker genügt meistens, um die bei Rohrzucker gewöhnliche Entwicklung zu hemmen. Das hängt vielleicht mit der von *Euler*[1]) festgestellten Tatsache zusammen, daß Aspergillus niger bei Peptonzusatz zur Nährlösung besonders reichlich Diastase bildet. Die Bedeutung der Diastase für das Auftreten und Verschwinden der Pilzstärke hat *Boas* mehrfach hervorgehoben; ich komme noch einmal darauf zurück.

Bei Verwendung von Asparagin als Nährstoff bekam ich in bezug auf die Pilzstärkebildung ein ähnliches Ergebnis wie bei Pepton, der Habitus der Mycelien aber war immer kräftig, fest und faltig. Hier wurde auch untersucht, welche Rolle die Quantität der Zugabe spielt. Der Anlaß dazu war die Angabe von *H. Lappalainen*, eine bestimmte Größe des Quotienten Stickstoffkonzentration : Kohlenstoffkonzentration sei zur Pilzstärkebildung erforderlich.

Sieben Kulturen wurden angesetzt in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt mit je 50 ccm Nährlösung. 5 Proz. Rohrzucker, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$, in geometrischer Reihe ansteigende Mengen Asparagin: 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 Proz. Temperatur 27°. 2 Tage nach der Impfung bekam jede Kultur 1 ccm 20proz. H_2SO_4; am nächsten Tage reagierten die Mycelien der drei niedrigsten Konzentrationen stark blau mit Jod, das vierte noch

[1]) *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme I, 296, München und Wiesbaden 1920.

einigermaßen, das fünfte sehr wenig, das sechste und siebente nur noch in Spuren. Daraufhin wurde noch eine Reihe unter denselben Bedingungen, nur ohne Säurezusatz, gezogen und im Alter von 3 Tagen geerntet. Alle Kulturen waren pilzstärkefrei. Die Mycelien wurden halbiert, je eine Hälfte 24 Stunden auf 0,7 n H_2SO_4 bei 30° gehalten, die andere bei 16° 15 Stunden auf 40 ccm 0,2proz. Lösung löslicher Stärke, der 1 ccm Toluol zugesetzt war. Dann wurde bei der ersten die Jodreaktion des Mycels, bei der zweiten die der Stärkelösung geprüft. Der Säuregehalt der Nährlösung wurde titrimetrisch bestimmt. Es ergab sich ein Absinken der Pilzstärkebildung, ein nicht ganz gleichmäßiges Ansteigen der Diastasewirksamkeit und der Azidität mit dem Ansteigen der vorher gegebenen Asparaginkonzentration.

Asparagin-konzentration Proz.	Verbrauch an n/30 NaOH auf 10 ccm der Nährlösung ccm	Jodreaktion der Stärkelösung	Jodreaktion des auf Säure übertragenen Mycels
0,312	17,8	rot	mehr blau als braun
0,625	52,5	violett	mehr blau als braun
1,25	22,3	violett	zu gleichen Teilen gemischt blau und braun
2,5	34,6	rotviolett	zu gleichen Teilen gemischt blau und braun
5	43,1	rotviolett	mehr braun als blau
10	53,0	rot	mehr braun als blau

Es fällt auf, daß die Kulturen, die die meiste Säure bildeten, am wenigsten Pilzstärke produzierten.

Bei Verwendung von NH_4NO_3 ist das Gegenteil der Fall. Die qualitative Bedeutung von mineralsaurem Ammonium, die darin liegt, daß bei seiner Assimilation die Mineralsäure frei wird, ist schon durch *Boas* klargestellt worden. Ich fand mit Erhöhung der NH_4NO_3-Konzentration eine Abnahme der Mycelmasse, aber eine Steigerung der Pilzstärkebildung; das liegt offenbar an der stärkeren Säurebildung.

Versuch: Sechs Kulturen wurden angesetzt in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt mit je 50 ccm Nährlösung. 10 Proz. Rohrzucker, 0,125 Proz. $MgSO_4$, 0,25 Proz. KH_2PO_4. Temperatur 20°.

NH_4NO_3-Konzentration	0,125 Proz.	0,25 Proz.	0,5 Proz.	1 Proz.	2 Proz.	4 Proz.
Jodreaktion im Alter von 5 Tagen	fast nur braun		blau und braun gemischt			stark blau

In einem Versuch mit KNO_3 erwies sich die Erhöhung des Quotienten Stickstoffkonzentration : Kohlenstoffkonzentration als belanglos für die Pilzstärkebildung. Um die verschiedene Höhe der Säurebildung möglichst auszuschalten, bekamen die Kulturen je 0,5 Proz. NH_4NO_3 wie sonst, außerdem aber KNO_3 in variierter Menge. Da in Gemischen verschiedener Stickstoffverbindungen nach *Boas* die Ammonsalze der Mineralsäuren immer bevorzugt werden, war eine wesentliche Änderung der Azidität bei einer Assimilation des KNO_3 (wenigstens in der ersten Zeit des Versuchs) nicht zu befürchten. Sechs Erlenmeyerkolben von 100 ccm

Inhalt bekamen je 25 ccm Nährlösung, 5 Proz. Rohrzucker, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$. Temperatur 30°. 2 Tage nach der Impfung ist eine deutliche Abnahme der Mycelmasse mit Steigerung der Nitratkonzentration zu erkennen, wie im vorigen Versuch, außerdem aber eine Abnahme der Blaufärbung mit Jod.

KNO_3-Zusatz	—	0,5 Proz.	1 Proz.	2 Proz.	4 Proz.	8 Proz.
Jodreaktion	ziemlich blau	stark blau		weniger blau		Spur blau

Die geringere Pilzstärkebildung der hohen Konzentrationen ist hier auf das schwächere Wachstum zurückzuführen; denn bei längerer Versuchsdauer reagieren sämtliche Kulturen stark blau mit Jod, die letzte 12 Tage nach der Impfung. Die Mycelmasse der niedrigeren Konzentrationen wird hier allerdings nicht erreicht.

Überblickt man die Stickstoffversuche, so ist klar, daß diejenigen mit NH_4NO_3 allein lediglich in bezug auf die Säurewirkung des Anions anzusehen sind. Die Versuche mit gleichzeitigem Zusatz von KNO_3 neben NH_4NO_3 können weiterhin nicht allein vom Gesichtspunkt des reinen Stickstoffumsatzes betrachtet werden. Denn NH_4NO_3 ist für alle gleich; eine erhöhte Stickstoffverarbeitung bei der steigenden KNO_3-Menge müßte freies Alkali bilden, so daß das Bild nicht eindeutig wäre. Dagegen zeigen die Asparaginversuche, daß *Lappalainens* Anschauung zutreffend sein dürfte; denn bei gleicher anorganischer Säure war die Pilzstärkebildung mit sinkender Stickstoffversorgung größer, obwohl bei höherer Asparaginzufuhr die Bildung (organischer) Säuren ganz erheblich stärker war. Es scheint also, daß eine reichliche Stickstoffernährung (von der Anionensäurewirkung abgesehen) den Kohlehydratstoffwechsel zurückdrängt, der andererseits bei geringerer Stickstoffversorgung in den Vordergrund tritt und unter geeigneten Säurebedingungen zur Pilzstärkebildung führt. Allgemein kommt ja dem Stickstoff-Kohlehydratverhältnis eine äußerst wichtige Rolle bei den Stoffwechselvorgängen zu.

Quantität der Kohlenstoffquelle. Der Satz von *Waterman*[1]), daß Änderungen der Konzentration und Temperatur nur die Geschwindigkeit des Stoffwechselprozesses beeinflussen, ist nicht richtig. Noch deutlicher tritt das bei Variation der Kohlenstoffkonzentration hervor. *Waterman* gibt in zwei Arbeiten[2]) an, er habe Glykogen bei Aspergillus niger gefunden. Auf die Frage, ob es sich bei seinen Versuchen wirklich um Glykogen handelte, komme ich noch zurück. Jedenfalls bekam auch ich unter Anwendung seiner Versuchsbedingungen Mycelien, die sich mit Jod braun färbten; diese Jodreaktion habe ich ja auch sonst

[1]) *H. J. Waterman*, Folia Microbiologica I, 4, 422.
[2]) *Derselbe*, l. c. und Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 3, 1, 1913.

schon mehrfach erwähnt. *Watermans* Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 2 Proz. Saccharose, 0,05 Proz. NH_4Cl, 0,05 Proz. KH_2PO_4, 0,02 Proz. $MgSO_4$, unterscheidet sich also von den von *Boas* und *Lappalainen* angewandten nur durch die Konzentration der Nährstoffe. Hier muß also der Grund liegen, weshalb *Waterman* niemals blaue, *Boas* niemals braune Jodreaktion erwähnt. In der Tat erhielt ich bei Variation der Zuckerkonzentration nur auf den mittleren Konzentrationen blaue, auf den unteren und oberen braune Jodreaktion.

Versuch: Sechs Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt, 25 ccm Nährlösung, Mineralsalze wie sonst, Temperatur 30°.

Saccharosekonzentration	1,25 Proz.	2,5 Proz.	5 Proz.	10 Proz.	20 Proz.	40 Proz.
Jodreaktion im Alter von 3 Tagen	fast rein braun	unten braun, oben blau	annähernd gleich, stark blau		gemischt, mehr braun	rein braun

Die mittleren Mycelien sind stark und wellig, die unteren und oberen schwächer, die oberen ganz glatt und weich. Zwischen 5 und 10 Proz. Saccharose liegt das Optimum. Hier ist das Wachstum so intensiv und die Ausbildung des Mycels so kräftig, wie sie unterhalb und oberhalb des Optimums auch bei einer Ausdehnung des Versuchs bis zum Eintritt deutlicher Autolyse nicht erreicht wird. Daß dies für die niedrigeren Konzentrationen gilt, liegt auf der Hand, weil hier schließlich Nährstofferschöpfung eintreten muß. Die Gültigkeit auch für die höheren Konzentrationen geht aus folgendem Versuch hervor:

Sieben Petrischalen von 9 cm Durchmesser mit je 50 ccm Nährlösung, Mineralsalze wie sonst, Rohrzuckerkonzentration variiert. Temperatur 30°. Impfung 2. Mai. Ergebnis in Tabellenform s. f. S.

Die quantitative und auch die qualitative Entwicklung (die Natur des gebildeten Polysaccharids) ist von der Konzentration des Rohrzuckers abhängig. Es ist anzunehmen, daß diese Regel auch für andere Kohlenstoffquellen gilt; das Gesetz der Höchstentwicklung bei einem Konzentrationsoptimum trifft ja allgemein zu. *H. Lappalainen* fand auch für Dextrose bei mittlerer Konzentration die längste Dauer der Pilzstärkereaktion, was sie damit erklärt, daß hier „weder das Enzym oder die Enzyme noch freie Säuren“[1]) produziert werden. Ich konnte hingegen zeigen, daß gerade im Zusammenhang mit dem stärksten Wachstum die stärkste Säuremenge gebildet wird, und gerade darauf führe ich die Pilzstärkebildung bei den betreffenden Konzentrationen zurück.

[1]) *H. Lappalainen*, Biochemische Studien an Aspergillus niger, S. 14. Helsingfors 1919.

Proz.	5. V.		12. V.		19. V.		26. V.		2. VI.	
	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung
10	fest, wellig, noch Lücken	mehr blau als braun	stärker geworden, reichlich Conidien	mehr blau als braun	nicht verändert	Falten grau, Buchten braun	nicht verändert	Buchten schwach blaugrau	kaum verändert	grau
15	fest, wellig, unten gelblich	mehr blau als braun	reichlich Conidien	unten blau, oben gemischt	nicht verändert	Falten grau, Buchten braun	nicht verändert	blaugrau	kaum verändert	grau
20	fest, wellig, noch Lücken	mehr blau als braun	dick, samtig, Spur Conidien	unten blau, oben gemischt	kaum verändert	nur unten schön blau	etwas mehr Conidien	gemischt	kaum verändert	schwach weinrot
25	dicht, weiß und weich	gleich blau und braun	weiß und weich	schmutzig bläulich	samtig	unten bläulich, oben braun	ganz wenig Conidien	kaum verändert	Beginn der Autolyse	schwach weinrot
30	weiß, ziemlich weich	gleich blau und braun	weiß und weich	schmutzig bläulich	weiß und samtig	unten bläulich, oben braun	ganz wenig Conidien	blaugrau	ziemlich starke Autolyse	Spur blau, sonst gelb
40	glatt, dünn und weich	mehr braun als blau	weiß und weich	mehr braun als blau	etwas samtig	unten Spur blau, oben braun	nicht verändert	—	keine Conidien, Autolyse	schwach weinrot, sonst gelb
50	glatt, dünn und weich	rein braun	weiß und weich	rein braun	ganz wenig samtig	unten Spur blau, oben braun	nicht verändert	—	keine Conidien, Autolyse	schwach weinrot, meist gelb

Versuch: Drei Reihen von Pilzkulturen wurden in Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt mit je 25 ccm Nährlösung gezogen, Mineralsalze wie sonst, Saccharosekonzentration in geometrischer Reihe gesteigert. Die erste Reihe wurde bei 20°, die beiden anderen bei 30° gehalten, die erste nach 6 Tagen geerntet, von den beiden anderen eine auch nach 6 Tagen und eine nach 3 Tagen, weil sie zu dieser Zeit augenscheinlich schon so weit entwickelt war, wie die bei 20° gezogene Reihe am sechsten Tage. Am Erntetage wurde in sämtlichen Nährlösungen die gebildete Säure durch Titrieren mit n/30 NaOH (Indikator Phenolphthalein) bestimmt; die erhaltenen Werte sind in den Kurven (Abb. 1) dargestellt. Auf der Abszisse ist der ursprüngliche Prozentgehalt an Saccharose abgetragen, auf der Ordinate die Säurenormalität der Nährlösung, ausgedrückt durch das Quantum n/30 NaOH, das zur Neutralisation von 10 ccm dieser Lösung notwendig ist. Alle drei Kurven steigen anfangs steil an bis zu einem Maximum, fallen dann ab, zuerst ziemlich steil, nachher recht flach. Dieses Verhalten stimmt mit der Ausbildung des Mycels überein; bis zu 8 Proz. aufwärts ist es kräftig, spröde und faltig, von 16 Proz. ab an Masse abnehmend, weich und glatt. Auch die Zu- und Abnahme des Pilzstärkegehaltes geht parallel mit der Kurve. Wenigstens der anfangs unerklärlich steile, nachher flache Abfall kommt auch in diesen Eigenschaften klar zum Ausdruck, der Anstieg bis zum Optimum ist hier weniger steil. Der Abfall der Säurekurve in den bei 30° gezogenen Reihen zwischen 1 und 2 Proz. und der erneute Anstieg zwischen 2 und 4 Proz. scheint regelmäßig aufzutreten, wenigstens zeigten ihn vier Titrationsreihen übereinstimmend, darunter auch eine, bei der mit Sporenemulsion, also so gleichmäßig wie möglich, geimpft worden war. Doch wurde diese Erscheinung nicht weiter verfolgt. In der bei 30° gezogenen 6 Tage alten Kultur ist das Maximum gegen das der 3 Tage alten nach rechts verschoben. Das hängt wahrscheinlich mit der häufig bemerkten Tatsache zusammen, daß bei niedrigen Konzentrationen der ganze Entwicklungsgang schneller durchlaufen wird, und infolgedessen hier der Säuregrad schon wieder zurückgeht, während er bei höheren Konzentrationen noch steigt.

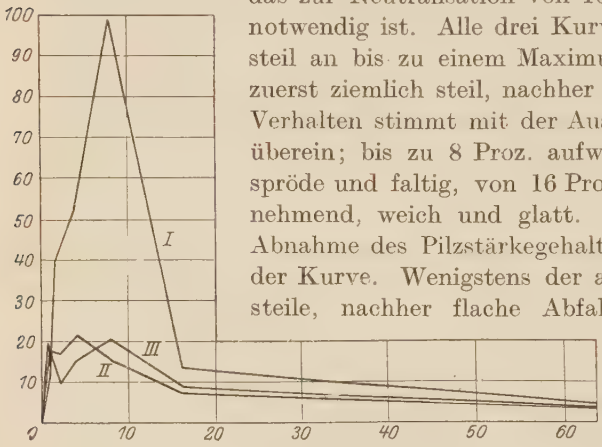

Abb. 1.
Kurve I: 6 Tage bei 20° gewachsen.
Kurve II: 6 Tage bei 30° gewachsen.
Kurve III: 6 Tage bei 30° gewachsen.

Temperatur. Das auffallend hohe Säuremaximum in der bei 20° gezogenen Reihe paßt gut zu der Angabe von *Wehmer*[1]), nach der Aspergillus niger bei 35° weniger Oxalsäure produziert als bei 15 bis 20°. Merkwürdig ist dagegen der verschiedene Einfluß der Temperaturverschiebung auf die Säure- und die Pilzstärkebildung. Denn sowohl bei *Boas* als auch bei *Lappalainen* findet sich die Angabe, zur Bildung der Pilzstärke sei eine Temperatur von mindestens 30° erforderlich. Meinen Versuchen nach ist sie zwar bei 20° auch noch möglich, aber bei 30 bis 40° intensiver; also gerade da stärker, wo die geringere Menge Säure gebildet wird. Bei den drei Reihen der Kurve reagierten die mittleren Kulturen der beiden 30°-Reihen tiefer blau mit Jod als die mittleren Kulturen der 20°-Reihe. Auch verschiedene Diastasewirksamkeit ist kaum dafür verantwortlich zu machen, denn das Temperaturoptimum der Aspergillusdiastase liegt wie das der meisten Enzyme über 30°.

Versuch: Ein Enzymextrakt, der durch Zerreiben einiger starker Mycelien mit Sand und Wasser gewonnen war, wurde mit Stärkelösung versetzt und das Gemisch in drei gleiche Teile geteilt. Der erste wurde bei 16°, der zweite bei 30° und der dritte bei 58° gehalten. Nach 1 Stunde war die Jodreaktion im ersten noch fast rein blau, im zweiten violettrot, im dritten rot.

Es muß also ein anderer, noch unbekannter Faktor für den Einfluß der Temperatur auf die Pilzstärkebildung verantwortlich sein. Darauf komme ich noch zurück.

Schichthöhe der Nährlösung: Vorher ist noch die Bedeutung der Schichtdicke der Nährlösung zu erwähnen.

Zwei Kulturen wurden angesetzt in zwei Flaschen mit gleicher Grundfläche und senkrechter Seitenwand, die eine bekam 25 ccm, die andere 250 ccm derselben Nährlösung (Zusammensetzung wie gewöhnlich, 5 Proz. Rohrzucker). Die Oberfläche der Nährlösung ist also in beiden gleich, die Schichthöhen verhalten sich wie 1 : 10. Nach viertägigem Wachstum bei 30° haben beide dichte, starke Pilzdecken; die auf 25 ccm ist spröde, lederig, faltig, Unterseite und Nährlösung sind kräftig gelb gefärbt, die Jodreaktion ist stark blau; die auf 250 ccm ist samtig, die Nährlösung kaum sichtbar gelblich, die Jodreaktion fast rein braun. Das Zustandekommen dieses Gegensatzes ist leicht zu erklären: produziert der Pilz in beiden Kulturen dieselbe Menge potentieller Säure, so wird die $H^{\cdot}$-Konzentration, von der ja der ganze Stoffwechsel abhängt, doch in der ersten größer als in der zweiten. Handelte es sich nur um bekannte schwache Säuren, so ließe sich die Differenz nach der *Ostwald*schen Verdünnungsgleichung berechnen. Da das nicht der Fall ist, genügt es, darauf hinzuweisen, daß die Änderung des Flüssigkeitsvolumens und der Azidität einander nicht vollkommen umgekehrt proportional sind.

[1]) *C. Wehmer*, Botan.-Ztg. **49**, 538, 1891.

Die produzierte Säuremenge scheint an sich, ohne Berücksichtigung des Dissoziationsgrades, nur abhängig von der Zuckermenge in der Volumeneinheit der Flüssigkeit und unabhängig von der Zuckermenge zu sein, die auf die Einheit der Oberfläche entfällt. Einigermaßen wird diese Vermutung durch den folgenden Versuch bestätigt. Acht Kulturen wurden in Flaschen von gleicher Grundfläche und senkrechter Seitenwand angesetzt. Mineralsalze wie gewöhnlich, bei allen in derselben Konzentration, Temperatur 20°.

Reihe 1:

Kultur	1	erhält	10	ccm	Nährlösung	mit	20,00	Proz.	Saccharose
„	2	„	20	„	„	„	10,00	„	„
„	3	„	40	„	„	„	5,00	„	„
„	4	„	80	„	„	„	2,50	„	„

Reihe 2:

Kultur	5	erhält	10	ccm	Nährlösung	mit	10,00	Proz.	Saccharose
„	6	„	20	„	„	„	5,00	„	„
„	7	„	40	„	„	„	2,50	„	„
„	8	„	80	„	„	„	1,25	„	„

Innerhalb jeder Reihe ist die Saccharosemenge pro Flächeneinheit in allen Kulturen dieselbe. Wäre die Säurebildung von dieser Größe abhängig, so müßten der Pilzstärkegehalt und die anderen damit zusammenhängenden Eigenschaften von 1 bis 4 und von 5 bis 8 gleichmäßig abnehmen. Das ist aber nicht der Fall; die Jodreaktion ist in den beiden mittleren Kulturen jeder Reihe mehr blau als braun, in den übrigen mehr braun als blau. Mit Ausnahme der Stellung der Kultur 5 paßt das Ergebnis zu den angenommenen Beziehungen. Eine nähere Untersuchung der Frage liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit.

Zusammenfassend läßt sich über die äußeren Entstehungsbedingungen der Pilzstärke sagen, daß ihre Wirkung sich zum Teil, aber nicht vollständig, auf Säure- und Diastasebildung zurückführen läßt bzw. auf die Rolle, die eine Steigerung des Verhältnisses N : C spielt durch Zurückdrängen des Kohlehydratstoffwechsels gegen den N-Stoffwechsel. Der unerklärte Rest (Temperatur) weist darauf hin, daß an der Bildung der Pilzstärke noch andere Faktoren beteiligt sind, deren Zusammenhang mit den eben besprochenen nicht ohne weiteres zu erkennen ist.

Bildung einer Vorstufe. Sie liegen im Innern der Pilzzelle. Die Pilzstärke wird nicht direkt aus den Zuckermolekülen synthetisiert, in die sie sich spalten läßt. Das ist schon aus der gleich guten Verwertbarkeit der verschiedenen Kohlenstoffquellen für Pilzstärkekulturen zu erkennen, sowie aus dem Umstand, daß sie nie in ganz jungen Mycelien auftritt. Sie entsteht vielmehr aus einer im Pilzkörper gebildeten Vorstufe, wie der folgende, mehrfach wiederholte Versuch zeigt: Ein junges Mycel, das auf der gewöhnlichen[1]) Nährlösung ge-

[1]) Diese enthält, wenn nicht anders angegeben, 5 Proz. Saccharose; Mineralsalze s. S. 225.

wachsen ist und erst eine dünne, noch pilzstärkefreie Decke bildet — dieser Entwicklungsgrad wird bei 20° in den meist verwendeten kleinen Kolben im allgemeinen in 2 bis 3 Tagen erreicht —, wird abgenutscht, ausgewaschen und auf eine Nährlösung übertragen, die die üblichen Mineralsalze, dazu 0,5 Proz. H_2SO_4, aber keine organische Substanz enthält. Nach 2 oder 3 Tagen wurde durch Jodzusatz auf Pilzstärke geprüft. Die Reaktion fiel regelmäßig positiv aus, manchmal sogar sehr stark, d. h. die Pilzstärke entsteht unter geeigneten Aziditätsbedingungen auch bei zeitweiligem Kohlenstoffhunger, also wahrscheinlich durch Umlagerung oder Abbau einer ebenfalls hochmolekularen Verbindung. Es ist meines Erachtens kaum anzunehmen, daß der Organismus in Hungerzeiten ein niedrig molekulares Kohlehydrat zu einem höher molekularen polymerisiert, anstatt es zu veratmen.

Chemische Natur der Vorstufe. Nun erhebt sich die Frage: Welches ist die Vorstufe der Pilzstärke? Pilzstärkefreies Mycel färbt sich braun mit Jod, was *Waterman* als Glykogenreaktion deutete. Neben dieser Jodfärbung hat er nur noch einen Nachweis dafür, nämlich die Reduktion *Fehling*scher Lösung durch den mit kochender HCl gewonnenen Pilzextrakt. Danach erscheint es mir recht zweifelhaft, ob er wirklich Glykogen gefunden hat. Denn ein von Pilzstärke befreites oder auch ursprünglich freies Mycel färbt sich immer mehr oder weniger braun mit Jod, auch nach dem Kochen mit verdünnter Säure oder Lauge, auch nach achtstündiger Extraktion mit Wasser im Soxhletapparat. Wendet man dieses Extraktionsverfahren auf pilzstärkefreies Mycel an, so geht zwar ein Polysaccharid in Lösung, das beim Kochen mit Säure reduzierenden Zucker liefert; dieses färbt sich aber nicht mit Jod oder wenigstens nur so schwach gelblich, daß es nicht der Träger der Jodreaktion im Mycel sein kann. Dagegen erhält man mit Chitin eine schöne braune Jodreaktion; Chitin ist an der Zusammensetzung der Zellmembran von Aspergillus niger beteiligt und hat durchaus die Resistenz gegen chemische Angriffe, die nach den genannten Versuchen von dem braun mit Jod reagierenden Stoff des Pilzes zu erwarten ist. Was die fragliche Umwandlung von Glykogen in Pilzstärke angeht, so läßt sich nur feststellen, daß Aspergillus zwar Glykogen abbaut, daß aber *Heinze*[1]) in seiner ausführlichen Arbeit über diesen Gegenstand nie ein mit Jod blau färbbares Zwischenprodukt bemerkte. Auch ich konnte weder mit noch ohne Säurezusatz eine solche Substanz aus Glykogen gewinnen.

Weiter war denkbar, die Pilzstärke entstände durch Desamidierung mit nachfolgender Umlagerung des Chitins. Ihre Entstehung müßte dann mit großer Wahrscheinlichkeit durch Übertragen einer jungen

---

[1]) *B. Heinze*, Centralbl. f. Bakt. II, **12**, 43, 177, 355, 1904.

Kultur auf stickstofffreie Nährlösung zu bewirken sein; ohne Säurezusatz gelang das aber nicht. Ausgeschlossen wird die Möglichkeit der Umwandlung des Chitins durch den Nachweis, daß der Pilz nicht imstande ist, Chitin anzugreifen.

Der Boden dreier Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt wurde mit Watte bedeckt und diese in zwei Kolben mit reinem, aus Krabbenpanzern nach der Methode von *Brach*[1]) dargestelltem Chitin bestreut. (Die Watte dient nur dazu, das Chitin an der Oberfläche zu halten.) In allen drei Kolben wurde die Watte mit 50 ccm Nährlösung von der gewöhnlichen Zusammensetzung, aber ohne Stickstoffverbindung, getränkt; alle drei wurden stark geimpft und bei 30° gehalten. In allen drei Kolben trat ein ganz schwaches Wachstum ein; nach 3 Tagen war ein außerordentlich dünnes, kaum makroskopisch sichtbares Häutchen gebildet, das auch nach 2 Wochen nicht stärker wurde. Nach einer Woche hatten alle drei Kulturen einige Konidien; Pilzstärke wurde nur nach Säurezusatz gebildet. Das Chitin blieb intakt, seine Jodreaktion änderte sich nicht, und das Wachstum darauf war ebenso gering wie in dem Kontrollkolben. Ob dieses Wachstum durch den Stickstoffgehalt der Sporen oder eine Verunreinigung einer der zugegebenen Substanzen, etwa der Watte, ermöglicht wurde, ist hier belanglos.

Die meisten Gründe sprechen wohl für die Annahme, daß das Paradextran oder die wahrscheinlich damit identische Fungose die Vorstufe ist. Dieses Polysaccharid wurde 1897 von *Tanret*[2]) als Bestandteil der Zellmembran bei Aspergillus glaucus, 1902 von *Iwanoff*[2]) bei Aspergillus niger nachgewiesen. Ich konnte ein Polysaccharid aus pilzstärkefreien Mycelien darstellen, das wahrscheinlich Paradextran ist. Die Kulturen waren 5 Tage auf einer Nährlösung gewachsen, die durch Ersatz des NH_4NO_3 durch KNO_3 von der üblichen abwich: sie färbten sich rein braun mit Jod. Sie wurden 6 Stunden im Soxhletapparat mit Wasser extrahiert, der Extrakt mit Alkohol versetzt, der dabei entstehende Niederschlag nach dem Absetzen abgenutscht, in kochendem Wasser wieder größtenteils gelöst und die Lösung unter dauerndem Filterwechsel durch einen Heißwassertrichter von dem schwärzlichen Rückstand abfiltriert. Beim Abkühlen scheidet sich aus der Lösung ein rein weißer, gallertiger Niederschlag ab. Er färbt sich fast gar nicht mit Jodjodkalium, gelb mit Chlorzinkjod, blau mit Jod und Schwefelsäure. Beim Kochen mit Säure liefert er ein Produkt, das *Fehling*sche Lösung und alkalische Jodlösung reduziert und die Farbreaktionen der Aldohexosen gibt. Eine besondere Reaktion fiel

[1]) *Brach*, diese Zeitschr. **38**, 468.
[2]) Siehe *J. Zellner*, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

mir an dem Präparat auf, die es mit der Pilzstärke teilt; beim Eindampfen der Lösung bildet sich an der Oberfläche der Flüssigkeit ein Häutchen, wie es *Tanret*[1]) bei Amylose beschrieben hat. Das Paradextranhäutchen färbt sich nicht mit Jod und gibt nach dem Kochen mit Säure die oben genannten Zuckerreaktionen. Vielleicht liegt die Gemeinsamkeit dieser Reaktion an einer chemischen Verwandtschaft zwischen Paradextran und Pilzstärke[2]). Einen sicheren Schluß lassen diese Reaktionen allerdings noch nicht zu.

Umwandlung der Vorstufe durch ein Enzym. Die nächste Frage war: Geht die Umwandlung der Vorstufe in die Pilzstärke unter Beteiligung eines Enzyms vor sich oder lediglich unter dem Einfluß der freien Säure? *Boas* hatte früher die Alternative gestellt: Wird die Pilzstärke aus Zucker durch Säure i. st. n. synthetisiert oder durch ein Enzym? Er kam damals zur Annahme der zweiten Möglichkeit auf Grund der Beobachtung, daß Säurezusatz vor der Impfung auf Nährlösungen die Bildung von Pilzstärke bewirkt, wo sonst keine entsteht. Später nahm er diesen Schluß zurück und sagte statt dessen, daß sie Membranstoffen entstamme, wie schon *H. Lappalainen* fand. Meiner Meinung nach schließt die Herkunft der Pilzstärke aus Membranstoffen die Beteiligung eines Enzyms bei ihrer Entstehung nicht aus. Daß tatsächlich eine solche notwendig ist, geht aus folgendem Versuch hervor: Vier junge, pilzstärkefreie Mycelien — 3 Tage bei 20° auf einer Nährlösung gewachsen, die neben den üblichen Mineralsalzen nur 1 Proz. Saccharose enthielt — wurden durch 10 Minuten langes Kochen abgetötet. Von jedem wurde eine Hälfte auf frische gewöhnliche Nährlösung übertragen, die andere Hälfte auf Nährlösung mit 0,5, 1,5, 5 bzw. 25 Proz. H_2SO_4-Zusatz. Nach dreitägigem Stehen bei 30° gab keiner der Teile eine bemerkenswerte Pilzstärkereaktion.

Lähmung der Pilzdiastase. Es ist allerdings nicht leicht anzunehmen, daß das betreffende Enzym nur unter den für die Pilzstärkebildung günstigen Umständen produziert wird. Diese Schwierigkeit wird durch die Anschauung von *Boas* behoben, nach der die Pilzstärkebildung durch Säurelähmung der Pilzdiastase zustande kommt. Die Säurebildung wäre demnach ein vom Pilze selbst geübtes Abfangverfahren.

[1]) *Tanret*, Chem. Centralbl. **1915**, II, 73; Bull. Soc. Chim. de France (4) **17**, 83.

[2]) Ein Paradextranpräparat, das ich mit einem wässerigen Auszug aus mit Sand zerriebenem Aspergillus niger-Mycel einen Tag stehen ließ, färbte sich nach dieser Behandlung schwach blau mit Jod; verdünnte H_2SO_4 ruft diesen Effekt in derselben Zeit hervor, 0,2proz. NaOH in 14 Tagen. Durch Züchten des Pilzes auf Paradextran als einziger Kohlenstoffquelle konnte ich eine solche Wirkung aber nicht ohne Säurezusatz erzielen.

Mir schien eine Nachprüfung dieser Verhältnisse notwendig zu sein, weil der Abbau der Pilzstärke oft vor dem Rückgang der Azidität einsetzt, und weil auch in solchen Kulturen Pilzstärke gebildet wird, die von Stärke als einziger Kohlenstoffquelle leben, also nach Versuchen von *Euler*[1]) besonders viel Diastase enthalten. Diese Erscheinung läßt sich allerdings auch dadurch erklären, daß die Säurelähmung der Diastase erst eingetreten ist, nachdem genug Stärke für den Aufbau des Organismus gespalten war; nach den folgenden Versuchen ist diese Deutung allein möglich.

Einige Pilzdecken, die 4 Tage bei 30° auf einem Nährboden gewachsen waren, der die üblichen Mineralsalze und 5 Proz. Kartoffelstärke als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, und sich mit Jodlösung schön blau färbten, wurden mit Sand zerrieben. Die entstandene Masse wurde zur Enzymgewinnung nicht wie sonst mit Wasser extrahiert, sondern mit der Nährlösung einer pilzstärkereichen Kultur, die ja die Azidität hat, bei der die Diastase unwirksam sein soll. (Die Nährlösung hatte ursprünglich die gewöhnliche Zusammensetzung — 5 Proz. Rohrzucker —, der Pilz war 4 Tage darauf gewachsen.) Zu einer Reihe von Proben des so gewonnenen Extraktes wurden steigende Mengen einer 2proz. Lösung löslicher Stärke in Wasser, zu einer zweiten Reihe entsprechende Mengen einer gleich starken Lösung in der genannten Nährflüssigkeit zugesetzt. Die Jodreaktion war in der zweiten Reihe noch nach 1½tägigem Stehen bei 30° (unter Toluol) fast dieselbe wie im Anfang des Versuchs; d. h. die Diastase ist praktisch unwirksam. In der ersten Reihe war die Stärke infolge der Verdünnung der Säure, allerdings nur unvollständig, abgebaut worden.

Bedeutung der Pilzstärke für den Organismus. Damit stimmt die Beobachtung überein, daß bei Übertragung mit Jod blau reagierender Mycelien auf kohlenstofffreie Nährlösung die Pilzstärke nur dann einigermaßen abgebaut wird, wenn man keine Säure zusetzt.

Versuch: Die Pilzdecken einer Zuckervariationsreihe wurden im Alter von 2 Tagen nach gründlichem Auswaschen auf eine Lösung

Saccharosegehalt der ersten Nährlösung	2 Proz.	3 Proz.	4 Proz.	5 Proz.	10 Proz.	20 Proz.
Jodreaktion bei Übertragung auf die C-freie Nährlösung	braun, Spur blau	blau			grau, Spur blau	braun, Spur blau
Jodreaktion nach 2 Tagen Hunger	braun, Spur blau	das alte Mycel ziemlich blau, das neue braun			braun, Spur blau	
Jodreaktion nach 4 Tagen Hunger	bräunlich, winzige Stellen blau			hellbraun		

[1]) *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme **1**, 296. München und Wiesbaden 1920.

der gewöhnlich gegebenen Mineralsalze ohne organische Substanz übertragen. Alle bildeten neue Hyphen und viele Konidien. Am vierten Tage hatte bei allen, besonders bei 3, 4 und 5 Proz. Autolyse eingesetzt.

Wiederholt man diesen Versuch mit einem Zusatz von 0,3 Proz. H_2SO_4 zu der kohlenstofffreien Nährlösung, so erhält man 3 Tage nach der Übertragung in allen Kulturen stärker blaue Jodreaktion als vorher und keine Konidienbildung. Läßt man die Mycelien auf ihrer ersten Nährlösung, so wird die Pilzstärke auch meistens dann abgebaut, wenn sich Konidien bilden. Sie dient also als Reservestoff, aber wohl wie das Paradextran nicht ausschließlich, sondern auch zur Festigung der Zellwand. Es läßt sich nicht sagen, ob sie ein normalerweise auftretendes Zwischenprodukt des Pilzstoffwechsels darstellt, das durch die Säure festgehalten und angehäuft wird, oder ob normalerweise an ihrer Stelle etwas anderes entsteht, vielleicht die Trehalose, die von *Bourquelot* bei Aspergillus nachgewiesen ist. Auch in der Trehala-Manna kommt ja die Trehalose neben dem Trehalum[1]) vor, einem Polysaccharid, das sich mit Jod blau färbt. Natürlich stehen solche Vermutungen auf unsicherem Boden, solange die chemische Konstitution der betreffenden Stoffe noch nicht aufgeklärt ist.

III. Chemie der Pilzstärke.

Darstellung. Die Untersuchung der chemischen Konstitution der Pilzstärke bildet den Inhalt des nächsten Teiles dieser Arbeit.

Das Untersuchungsmaterial wurde auf folgendem Wege gewonnen: Der Pilz wurde in Petrischalen von 28 cm Durchmesser und 7 cm Höhe gezogen. Jede dieser Schalen bekam 1 Liter der schon öfter genannten Nährlösung. Nährlösung und Schalen wurden getrennt sterilisiert, die Schalen meist nicht durch Hitze, sondern durch Ausspülen zuerst mit einer Lösung von $K_2Cr_2O_7$ in konzentrierter H_2SO_4, dann mit 50proz. Alkohol. Drei solcher Schalen wurden in einem auf 30° gehaltenem Thermostaten, nur durch eine Schicht Wellpappe voneinander getrennt, übereinander aufgestellt. Durchschnittlich alle 5 Tage waren kräftige, faltige, pilzstärkereiche Mycelien erntereif. Der Pilzstärkegehalt der Nährlösung war nie beträchtlich groß, auch ist die Darstellung der Substanz aus der Nährlösung schwierig; Alkohol fällt daraus nach anfänglicher weißer Trübung einen braunen Syrup, der noch andere Stoffwechselprodukte des Pilzes enthält. Daher beschränkte ich mich auf die Gewinnung der Pilzstärke aus dem Mycel. Die Pilzdecken wurden ausgewaschen und in einem Soxhletapparat 8 bis 10 Stunden mit Wasser extrahiert. Dabei scheint die Pilzstärke unverändert zu bleiben, während ein Extrakt, der bei 130° und 2 Atmosphären Druck im Autoklaven gewonnen wurde, sich mit Jod violett färbte; hier lag also schon ein Abbau vor. Zu dem Extrakt, der

[1]) *Scheibler* und *Mittelmeier*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **26**, 1331, 1893.

meistens alle nachweisbare Pilzstärke des Mycels aufgenommen hatte, wurde Alkohol zugefügt, bis die Flüssigkeit 58 bis 60 Proz. Alkohol enthielt. Der Niederschlag setzte sich über Nacht ab. Er wurde dann abgenutscht, für quantitative Bestimmungen in einen gewogenen Goochtiegel, sonst auf ein großes gehärtetes Filter. Die Ausbeute aus einer Pilzernte betrug 0,5 bis 1 g; da aber — nach *Lappalainen* — verschiedene Stämme verschieden starke Neigung zur Pilzstärkebildung haben, so läßt sich aus anderen Stämmen vielleicht eine bessere Ausbeute erzielen. Dem Pilzstärkegehalt der Nährlösung nach bilden *H. Lappalainens* Stämme jedenfalls größere Mengen der Substanz als der von mir verwendete.

Die so erhaltene Pilzstärke ist noch stark verunreinigt. Die Berlinerblauprobe zeigt noch Stickstoffgehalt an. Welches die beigemengten Substanzen sind, ließ sich nicht feststellen. Im Extrakt ist eine ganze Reihe solcher Stoffe nachzuweisen: ein gelb gefärbter Stoff, der sich in organischen Lösungsmitteln nicht löst; ein anderer, der in die Alkoholfällung mitgeht, der sich beim Ausschütteln in Äther löst, wobei sich die Lösung nur langsam unter Entwicklung von Gasperlen in fast fester, gallertiger Form über dem Wasser sammelt. Nach dem Verdunsten des Äthers erhält man einen amorphen, weißen, nach Gummi riechenden Niederschlag. Auch organische Säuren werden natürlich im Ätherextrakt sein. Kocht man das Mycel vor der Wasserextraktion einige Stunden mit Äther aus, so ist es nachher nicht mehr spezifisch leichter als Wasser; vielleicht einfach deshalb, weil dann die Luft zwischen den Hyphen besser durch Wasser verdrängt werden kann. Der Äther löst dabei eine offenbar ungesättigte Verbindung — vielleicht ein Ergosterin —, die sich vorher bemerkbar macht, indem sie die bei Jodzusatz eintretende Blaufärbung der Pilzstärke allmählich zum Verschwinden bringt. Setzt man dann von neuem die gleiche Jodmenge zu, so geht die Entfärbung langsamer, bei jeder nächsten Wiederholung noch langsamer, bis sie ganz ausbleibt und ein blauvioletter Niederschlag ausfällt. Die Erscheinung der wiederholten Entfärbung kann man bei Fettzusatz zu einer Stärkelösung künstlich hervorrufen. Manchmal tritt allerdings auch nach vorausgegangener Ätherextraktion des Mycels eine plötzliche Entfärbung der Jodpilzstärke ein, deren Ursache ich nicht weiter nachgegangen bin. Der Extraktionsäther setzt bei längerem Stehen einen schleimigen, nach Bouillon riechenden Niederschlag ab. Unterbleibt die Ätherauskochung, so geht der Geruchsstoff in den wässerigen Extrakt, wird aber nicht durch Alkohol gefällt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols setzt er sich auch hier allmählich als farbloser Niederschlag ab, die überstehende Flüssigkeit scheint bei Zusatz starker Säuren neue ähnliche Geruchsstoffe zu bilden. Ein anderer Körper läßt sich mit Wasserdampf in geringer Menge überdestillieren und erstarrt im Kühler. Die meisten dieser Stoffe gehen nicht mit in die Alkoholfällung hinein. Auch ist keine mit *Fehling*scher Lösung fällbare Substanz darin enthalten, wie sie *Karrer*[1]) bei der Darstellung des Isolichenins als Nebenprodukt fand. Trotzdem erhält man die Pilzstärke bedeutend reiner durch Wiederauflösen und Wiederfällen, wie die quantitative Zuckerbestimmung nach der Säurespaltung zeigt, und auch schon ihr Aussehen: solange er wasser- oder alkoholhaltig ist, sieht zwar auch der einmal gefällte Niederschlag rein weiß aus, nach dem Trocknen aber erscheint er schmutzig braun; der zweimal oder dreimal gefällte dagegen bildet beim Trocknen farblose,

[1]) *Karrer* und *Joos*, H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. **135**, 311, 1924.

durchscheinende Blättchen. Der Materialersparnis wegen begnügte ich mich meist mit zweimaliger Fällung.

Häutchenbildung und Retrogradation. Dampft man Pilzstärkelösung ein, so bildet sich neben etwas braunem Sirup, wie schon erwähnt, auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein Häutchen, das sich mit Jodlösung blauviolett färbt und nach dem Kochen mit Säure Zuckerreaktionen gibt. Dieselbe Reaktion ist von der Stärke bekannt; nach *Tanret*[1]) wird sie durch die Inhaltssubstanz des Stärkekorns, die Amylose, verursacht, indem sich diese in der Hitze kondensiert.

Eine langsame Kondensation der Amylose bei längerem Stehen in der Kälte führt nach *Maquenne*[2]) zu der Retrogradation, einer Abscheidung der in eine unlösliche Form übergegangenen Substanz. Dieselbe Erscheinung ist auch bei Pilzstärkelösung zu beobachten. Diese Koagulation wird durch Zusatz von $FeCl_3$ oder $Al_2(SO_4)_3$, viel weniger durch H_3PO_4 beschleunigt; sie scheint demnach mit der elektrisch negativen Kolloidnatur der Substanz zusammenzuhängen, wenn sie auch weit langsamer vor sich geht als sonst Kolloidfällungen durch Elektrolyte. (Die kolloidale Natur der Pilzstärke zeigt sich darin, daß sie nicht durch Kollodiummembran dialysierbar ist.) Aus dem Pilzextrakt scheint noch eine andere Substanz mit auszufallen; steht er einen Tag, so scheidet sich ein bräunlicher Niederschlag ab; er färbt sich violett, die darüber stehende Flüssigkeit fast nicht mehr mit Jod. Bei längerem Stehen trennt sich der Niederschlag in zwei Schichten, eine obere weiße und eine untere braune; der Träger der Jodreaktion ist die weiße. Steht sie 8 bis 10 Tage, so bekommt man keine Jodfärbung mehr.

Salzhydrolyse. Noch regelmäßiger als das Absetzen des Niederschlages ist im Extrakt die Änderung der Jodreaktion. Färbt sich der Extrakt auch in frischem Zustande rein blau mit Jod, so gibt er doch nach einigen Stunden nur noch ein Violett und am nächsten Morgen nur noch Rot, und auch dies verschwindet bei genügend langer Versuchsdauer wohl immer. Es handelt sich offenbar um dieselbe Erscheinung, die *Biedermann*[3]) an Stärke und Amylose untersucht und als Salzhydrolyse gedeutet hat. Die Übereinstimmung beider Vorgänge ist beachtenswert; die Abbaustufen der Pilzstärke geben dieselben Farben mit Jod wie die der Stärke oder der reinen Amylose.

Säurehydrolyse. Dasselbe ergibt sich beim Kochen mit Säure.

---

[1]) l. c.

[2]) Siehe unter anderen *Pringsheim*, Die Polysaccharide, 2. Aufl., S. 119. Berlin 1923.

[3]) *W. Biedermann*, diese Zeitschr. **135**, 282, 1923; Zeitschr. f. angew. Chem. **37**, 71.

Versuch: 0,18 g einmal gefällte Pilzstärke, in 50 ccm Wasser gelöst, wurde mit 1 Proz. H_2SO_4 2 Stunden gekocht; 0,5 ccm der Lösung färben sich mit einem Tropfen n/100 Jodlösung:

vor der Hydrolyse	. . . . .		rein blau,
nach	½stündiger	Hydrolyse	. . . violett,
„ 1	„	„	. . . weinrot,
„ 1½	„	„	. . . gelblich rosa,
„ 2	„	„	. . . gelbbraun.

Ein Stärkekleister von entsprechender Konzentration gibt unter diesen Bedingungen dieselben Abbaustufen, doch wird die Leiter im ersten Teile langsamer, im zweiten Teile etwas schneller durchlaufen als bei Pilzstärke. Reine Amylose dagegen, die durch Erwärmen von 2 g Kartoffelstärke mit 100 ccm Wasser bis auf 58° und Abfiltrieren der entstandenen Lösung gewonnen war [nach *Ling* und *Nanji*[1])], durchläuft sie mit derselben Geschwindigkeit wie Pilzstärke.

Das Endprodukt der Säurespaltung scheint auch bei Pilzstärke ausschließlich Glucose zu sein. Sie wurde für den Zweck der Zuckerbestimmung 3 Stunden mit 2 Proz. H_2SO_4 am Rückflußkühler gekocht, mit $Ba(OH)_2$ unter Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein neutralisiert, vom $BaSO_4$ abfiltriert und, wenn nötig, etwas eingedampft. Die so erhaltene Zuckerlösung ist der alkoholischen und der Buttersäuregärung fähig: ein Teil wurde mit einem der vorhandenen Zuckermenge schätzungsweise gleichen Gewicht Preßhefe geschüttelt und in ein *Einhorn*sches Gärröhrchen gefüllt und bei 30° gehalten; schon nach 1½ Stunden hatte in diesem kräftige, in einem Kontrollröhrchen (Hefe + Wasser) keine Gasentwicklung stattgefunden. Ein anderer Teil wurde mit 1,5 Proz. Agar-Agar und den erforderlichen Mineralsalzen sterilisiert und mit Bac. amylobacter geimpft; 2 Tage darauf starke Gasentwicklung und Buttersäuregeruch. Vor allem der Hefeversuch beweist die Anwesenheit von Hexosen.

Auf die Abwesenheit von Pentosen läßt sich aus dem Verlauf der Furfurolreaktion schließen; die beim Erwärmen von Pilzstärke mit H_2SO_4 entstehenden Dämpfe röten Anilinacetatpapier nur schwach, nicht stärker als die aus reiner Glucose.

Molischs Reaktion tritt mit der Zuckerlösung erst nach einer Minute ein, die Resorcinreaktion erst beim Erwärmen; beim Unterschichten mit konzentrierter H_2SO_4 entsteht kein brauner Ring; demnach sind keine Ketosen, nur Aldosen vorhanden[2]).

Mit Phenylhydrazin und Essigsäure gibt die Zuckerlösung in der Kälte und bei gelindem Erwärmen keinen Niederschlag, wodurch die

[1]) *Ling* und *Nanji*, Journ. Chem. Soc. of London **123**, 2666.

[2]) *B. Tollens*, Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate. 3. Aufl. Leipzig 1914.

Gegenwart von Mannose ausgeschlossen wird. Nach einstündigem Kochen entsteht ein gelber Niederschlag, der Glucosazon enthält und nach dem Umkristallisieren aus pyridinhaltigem Wasser und Alkohol annähernd den richtigen Schmelzpunkt zeigt, nämlich 204°.

Für quantitative Bestimmungen des Zuckers wurde die zweimal gefällte Pilzstärke in einen gewogenen Goochtiegel filtriert und bei 100° bis zur annähernden Gewichtskonstanz getrocknet. (Ich mußte mich mit dem annähernden Wert begnügen, da die Substanz bei der Trockentemperatur leicht an der Oberfläche unter Bräunung und Röstgeruch etwas zersetzt wird; auch ist sie hygroskopisch.) Der Goochtiegel wurde dann in ein Becherglas gebracht, die Pilzstärke gelöst und, ohne vom Asbest abzufiltrieren, hydrolysiert und neutralisiert. Die Analyse wurde nach der Hypojoditmethode von *Willstätter* und *Schudel* in der von *Auerbach* und *Bodländer*[1]) modifizierten Form ausgeführt, und zwar mit n/100 Jod- und Thiosulfatlösung. Der Berechnung wurde die Annahme zugrunde gelegt, der reduzierende Zucker sei ausschließlich Glucose. Als günstigste Ausbeute wurden gefunden: 0,271 g Glucose aus 0,267 g Pilzstärke. Der theoretische Wert wäre für eine reine, nur aus anhydridartig verknüpften Glucosemolekülen aufgebaute Verbindung 0,297 g Glucose. Die Ausbeute beträgt also 91,2 Proz. der Theorie. In verschiedenen anderen Analysen ergaben sich etwas niedrigere Werte, aber nicht weniger als 80 Proz. der Theorie.

Dagegen bei der Bestimmung auf optischem Wege — wieder unter der Voraussetzung, es handelte sich ausschließlich um Glucose — fand ich einmal 0,325 g Glucose aus 0,358 g Pilzstärke, d. h. 81,7 Proz. der Theorie; sonst noch niedrigere Werte. Das Zurückbleiben der Drehung hinter der Reduktion liegt wahrscheinlich an optisch aktiven Verunreinigungen; *Boas* erhielt ja auch bei der Bestimmung der spezifischen Drehung der unzersetzten Pilzstärke Werte, die zwischen $+120$ und $+160°$ für $[\alpha]_D$ schwankten. Trotzdem kann meine Voraussetzung als genügend bestätigt gelten, denn die spezifische Drehung der sonstigen natürlich vorkommenden Hexosen weicht so weit von der der Glucose ab, daß eine Beimengung einer von ihnen in auch nur einigermaßen beträchtlichen Mengen ausgeschlossen erscheint.

Vergärung durch Bacillus macerans. Die nächste Frage war die nach dem Verhalten der Pilzstärke gegenüber Enzymen.

Hier sei zuerst die Vergärung durch Bacillus macerans *Schardinger* erwähnt. Vier Röhrchen mit 3 ccm annähernd 2proz. Pilzstärkelösung, der die von *Schardinger* angegebenen Nährsalze[2]) zugesetzt waren,

[1]) *Auerbach* und *Bodländer*, Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, Nr. 77.
[2]) *F. Schardinger*, Zentralbl. f. Bakt. II, **22**, 98.

wurden mit dem Bacillus[1]) geimpft und bei 25° gehalten. Obwohl während der drei Sterilisiertage schon Retrogradation eingetreten war, war doch nach 1½ Tagen im ersten und nach 2½ Tagen in zwei weiteren Röhrchen die Gärung lebhaft im Gange. Die Vergärung der Pilzstärke durch Bacillus macerans ist eine weitere Analogie zu dem Verhalten der Stärkebestandteile.

Spaltung durch Amylasen und Emulsin. Auch durch Diastase wird Pilzstärke abgebaut; das Endprodukt ist auch hier Maltose. Nachweis: Eine Lösung von 0,1 g Pilzstärke in 10 ccm Wasser wurde mit gefällter Malzdiastase, die sich in einer Kontrollprobe als maltosefrei erwies, 2 Stunden bei 50° gehalten. Dann wurde sie 10 Minuten mit 10 Proz. NH_4OH gekocht und färbte sich dabei schön krapprot. Diese Reaktion geben nach *Wöhlk*[2]) nur Maltose und Lactose, sie kann also hier nur von Maltose herrühren.

Um so auffallender sind die mit Jod färbbaren Zwischenprodukte beim Abbau der Pilzstärke mit Malzdiastase. Die Achroodextrinstufe wird merkwürdig schnell erreicht, und vorher treten keine Dextrine auf, die sich mit Jod violett, rot oder bräunlich färben, sondern es gibt nur eine Leiter von verschiedenen blauen Tönen. Eine Pilzstärkelösung, die bei Jodzusatz dunkelblau wird, gibt nach kurzer Einwirkung eines Malzauszuges oder von mit Alkohol aus einem solchen Auszug gefällter Amylase hellblaue Jodreaktion, nach doppelt so langer Einwirkung etwas heller blau, und so fort; schließlich ist keine Farbreaktion mehr zu erkennen. Genau so geht es mit Pankreasamylase, sowohl mit einem Extrakt aus einem frischen Schweinepankreas als auch mit Pankreatin (von *E. Merck*). Der Pilz selbst baut dagegen die Substanz über Zwischenstufen ab, die sich mit Jod violett bzw. rot färben; in der Nährlösung älterer Kulturen sind solche oft zu beobachten. Das haben auch schon *Boas* und *Lappalainen* angegeben. Die von Bacillus macerans vergorenen Pilzstärkelösungen färbten sich ebenfalls braunrot mit Jod.

Der auffallende Gegensatz der Zwischenprodukte beim Abbau von Kartoffelstärke und Pilzstärke durch Malz- und Pankreasdiastase, der doch bei beiden zum gleichen Endprodukt führt, veranlaßte mich, in Anbetracht der bisher in allen Reaktionen gefundenen Übereinstimmung zwischen Pilzstärke und Amylose, den Abbau der beiden Bestandteile der Kartoffelstärke in Hinsicht auf diese Zwischenprodukte gesondert zu verfolgen. Bisher ist merkwürdigerweise ihr Verhalten in dieser Beziehung nur für das in der Stärke vorliegende

[1]) Bezogen aus der vorm. Králschen mikrobiol. Sammlung von *E. Přibram*, Wien.

[2]) Nach Biochem. Arbeitsmethoden **2**. Berlin und Wien 1910.

Gemisch der beiden Substanzen beschrieben worden. Amylose und Amylopektin wurden nach der Ausfriermethode von *Ling* und *Nanji*[1]) rein dargestellt. Das Amylosepräparat verhielt sich beim Abbau mit Malz- und Pankreasdiastase genau so wie Pilzstärke. Mit Bakteriendiastase liefert sie auch ein Erythrodextrin, wie ich gelegentlich einer Kultivierung von Bacillus amylobacter auf Amyloselösung feststellte[2]). (Ein Parallelismus zwischen der Art der Einwirkung durch Bacillus amylobacter und Bacillus macerans ist wohl wenigstens für die ersten Stadien anzunehmen, zumal nach *Villiers*[3]) auch Bacillus amylobacter zu 0,3 Proz. der angewandten Stärke ein kristallisiertes Produkt liefert, das allerdings von chemischer Seite weniger Beachtung gefunden hat.)

Auf das Verhalten des Amylopektins gegen Malz- und Pankreasdiastase sowie auf die Bedeutung der merkwürdigen Reaktion der Amylose mit diesen beiden Enzymen werde ich später eingehen. Hier kommt es nur auf die Übereinstimmung der Amylose mit der Pilzstärke an.

Auch mit Emulsin, das nach *R. Kuhn*[4]) Stärke langsam abbaut, reagieren beide in derselben Weise und mit derselben Geschwindigkeit. Ein Emulsinpräparat wurde nach der Methode von *Hérissey* und *Bourquelot*[5]) aus süßen Mandeln dargestellt. Eine Pilzstärke- und eine Amyloselösung, die gleich intensive Jodfärbung gaben, wurden zu gleichen Teilen in je vier Reagenzröhrchen verteilt; je zwei der Röhrchen bekamen einen Zusatz von Emulsin in fester Form, alle acht bekamen eine Toluoldecke und wurden bei 30° gehalten. Nach 40 Stunden wurde aus jedem Röhrchen eine Probe von 1,5 ccm entnommen und mit 0,5 ccm n/1000 Jodlösung versetzt. Alle vier emulsinfreien Proben färbten sich gleich dunkelblau, alle vier emulsinhaltigen gleichmäßig ganz hellblau mit einem schwachen Stich ins Rötliche. Die Reaktion mit Emulsin verläuft demnach über dieselben Zwischenstufen wie die mit Malz- und Pankreasdiastase.

Das Ptyalin nimmt eine Sonderstellung ein. Die Stufen beim Abbau mit diesem Enzym zeigen bei Prüfung mit sehr schwachem Jodzusatz dasselbe Verhalten — abnehmende Blaufärbung — wie

---

[1]) l. c.

[2]) Bei Kulturen von Bac. amylobacter auf Amylopektin wurde ebenfalls ein Erythrodextrin gebildet, hier geht aber der Abbau viel langsamer vonstatten als bei Amylose; dadurch erklärt es sich, daß der Bacillus zwar auf Stärkekleister gut wächst, in Kartoffelkulturen aber die Stärkekörner nicht korrodiert, da das Amylopektin deren Hüllsubstanz bildet.

[3]) *Villiers*, Bull. Soc. chim. de France (3) **5**, 470, 1890.

[4]) *R. Kuhn*, H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. **135**, 12, 1924.

[5]) Nach *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme **2**. München und Wiesbaden 1922.

die Stufen beim Abbau mit Malzdiastase; bei Verwendung stärkerer Jodkonzentrationen dagegen kann man dieselbe Skala — blau, violett, rot, bräunlich — erhalten, wie beim Abbau mit kochender Säure. Der Abbau von Amylose aus Kartoffelstärke und von Pilzstärke verläuft auch hier gleichsinnig.

Nachdem nun bei so vielen Reaktionen das gleiche Verhalten von Pilzstärke und Amylose nachgewiesen wurde (auch auf die übereinstimmenden Löslichkeitsverhältnisse sei noch hingewiesen), darf man wohl behaupten, daß die beiden Substanzen identisch sind, wenn auch auf die Darstellung von Amylobiose, Dihexosan, Lävoglucosan, der Acetyl- und Methylderivate usw. angesichts der Verunreinigungen und der geringen zur Verfügung stehenden Menge des Präparats verzichtet werden mußte.

Diastatische Spaltung von Isolichenin und Iogen. Die neue Amylosereaktion wurde auch an der Flechtenstärke, dem Isolichenin, nachgeprüft, dessen Identität mit der Amylose *H. Pringsheim*[1]) kürzlich feststellte. Es ergab sich ein neuer Beweis für diese Feststellung: Durch kurzes Auskochen von getrocknetem Isländischen Moos im Soxhletapparat wurde ein Extrakt gewonnen, der beim Eindampfen übrigens auch ein jodpositives Häutchen bildete. Bei Behandlung mit Malzauszug gab er nur blaue Jodreaktion in abnehmender Intensität, aber keine violetten oder roten Töne; das war trotz seiner gelbbraunen Eigenfarbe deutlich zu erkennen. Beim Kochen mit Säure dagegen trat wie bei der Amylose eine Erythrodextrinstufe auf.

Das Isolichenin scheint kein direktes Produkt einer Photosynthese der Flechtenalgen zu sein; nach *Ziegenspeck*[2]) kommt es außer bei Cetraria islandica, wo es auch im Thallus enthalten ist, nur im Hymenium vor und verschwindet bei der Reife der Asken. Vielleicht kann man auch hierin eine Verwandtschaft mit der Pilzstärke erblicken. Wenn *Karrer-Joos* (zitiert S. 240) die *Pringsheim*sche Feststellung der Identität des Isolichenins mit der Amylose nicht völlig bestätigen konnten, sondern zum Teil ein Polysaccharid fanden, das Mannose und Galaktose ergab, so könnte das einmal am Material liegen; sodann kann jedoch ihre Fraktion B, die nur Dextrose ergab, Amylose darstellen. Ich fand, wie erwähnt, keine Mannose und keine mit *Fehling* sich niederschlagende Fraktion A bei meinem Aspergillus.

Auch mit einem Bakterienpolysaccharid wurde die Reaktion ausgeführt, dem „Iogen" des Bac. amylobacter *A. M.* et *Bredemann.* Eine zerkleinerte Kartoffel wurde ausgekocht, der abgenutschte Extrakt mit 1,5 Proz. Agar-Agar sterilisiert und in Petrischalen gegossen. Diese wurden

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 1581, 1924.
[2]) *Ziegenspeck*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1924, H. 4, S. 116

mit Bac. amylobacter beimpft und bei 25° in einem Vakuumexsikkator gehalten, der unmittelbar vor dem Evakuieren mit 100 ccm 10proz. KOH und 10 g Pyrogallol beschickt wurde. 2 Tage nach der Impfung hatten sich runde, stark iogenhaltige Kolonien entwickelt, die sich mit Jodlösung blau bis violett färbten. Zwei solcher Petrischalen wurden mit einem Malzauszug (5 g Malz 15 Minuten mit 100 ccm Wasser extrahiert) und etwas Toluol übergossen. Nach 24 Stunden färbten sich die Kolonien zwar noch bläulich mit Jod, aber schwächer als tags zuvor; der Abbau ist hier verzögert, wahrscheinlich weil die Zellwand für die Malzdiastase nur wenig permeabel ist. Eine Rotfärbung mit Jod war nicht zu beobachten. Möglicherweise ist das Iogen des Bac. amylobacter ebenfalls Amylose, ebenso die Polysaccharide der anderen in der Einleitung genannten Bakterien. Die „Stärke", die *Grey*[1]) bei Bacterium coli untersucht hat, kann nach den von ihm angegebenen Reaktionen — Blaufärbung mit Jod, Aufspaltung in Glucose, stark schwankende Werte für $[\alpha]_D$ — wohl hierher gehören.

IV. Diastatische Spaltung der Amylose.

Nun erhob sich die Frage nach dem Zustandekommen der Spaltung der Amylose durch Enzyme vom Typus der Malzdiastase. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die Diastasen verschiedener Herkunft sich nicht gleich verhalten; über eine eventuelle Begründung dieser Tatsache durch Unterschiede in ihrer Konstitution läßt sich selbstverständlich zurzeit noch nichts aussagen; darum sei hier nicht näher darauf eingegangen. Ausführlicher untersucht wurden auch nur Malz- und Pankreasdiastase. Bei diesen beiden verläuft der Abbau so, daß die aufeinander folgenden Dextrinstufen bei Zusatz der gleichen Menge Jodlösung immer hellere Nuancen der blauen Farbe geben, die man mit der ursprünglichen Amyloselösung erhält; man kann die blassesten Töne ebensogut durch Verdünnen dieser ursprünglichen Lösung erzielen. Die mittleren haben allerdings einen ganz schwachen Stich ins Rötliche, die Abweichung ist aber so gering, daß man doch die Verdünnung gut zur kolorimetrischen Messung des Reaktionsverlaufs benutzen kann. Diese wurde folgendermaßen durchgeführt: Eine Reihe von Reagenzgläsern mit flachem Boden und untereinander gleichem Durchmesser bekamen je 0,5 ccm n/1000 Jodlösung. In gleichen Zwischenräumen, die an einer Sekundenuhr abgelesen wurden, wurden je 5 ccm aus einer mit Malzauszug versetzten Amyloselösung in eines dieser Gläser gefüllt. In das Vergleichsröhrchen kamen 5 ccm der diastasefreien Ausgangslösung; davon wurde der Teil dieses Volumens wieder herausgenommen und durch Wasser ersetzt, der dem Zusatz an Malzauszug zu dem anderen Teile der Lösung entsprach, außerdem wurden 0,5 ccm der Jodlösung zugesetzt. Aus einer Bürette ließ ich so viel destilliertes Wasser hinzulaufen, bis die Farbintensität der

[1]) *E. Ch. Grey*, Biochem. Journ. **18**, 712, 1924.

ersten Abbaustufe erreicht war; darauf wurde diese Abbaustufe in derselben Weise verdünnt, bis ihre Farbintensität der der nächsten Probe gleichkam, und so fort. Aus dem Volumen des zugegebenen Wassers wurde der jeweilige Verdünnungsgrad berechnet; die so erhaltenen Zahlen ergaben die Kurven (Abb. 2).

Die Konzentration der Amyloselösung war bei allen drei Kurven annähernd dieselbe: 3 g Kartoffelstärke wurden in 100 ccm Wasser auf 56 bis 57° erwärmt. Von der abfiltrierten Lösung wurden 50 ccm mit je 5 ccm Malzauszug versetzt. 1 g Malz war bei Kurve I 25 Minuten, bei Kurve II 15 Minuten, bei Kurve III nur 5 Minuten mit 100 ccm Wasser extrahiert worden. Die Anzahl Kubikzentimeter ist von der Abszisse aus, die die Zeit in Minuten angibt, nach unten abgetragen. Auf diese Weise ist besser als bei dem Spiegelbild, das durch Abtragen nach oben entstünde, die Ähnlichkeit dieser Kurve mit derjenigen zu erkennen, die *R. Kuhn*[1]) vor kurzem bei der Messung der Maltosebildung aus Stärke und Amylose gefunden hat (nach Umrechnung auf das Gleichgewicht zwischen α- und β-Maltose). Die Kurve, die ich bei Verwendung einigermaßen starker Enzymkonzentrationen erhielt (I), entspricht der *Kuhn*schen als ganzes; bei der Kurve der schwächsten Enzymkonzentration (III) tut es nur der zweite Teil; Kurve II — mittlere Enzymkonzentration — stellt einen Übergang dar zwischen I und III. Bei Kurve III treten zwei aufeinander folgende Reaktionen deutlich hervor: die erste ist vielleicht eine Bindung zwischen Enzym und Substrat [vielleicht auch eine „Dissoziation" der von *Pringsheim*[2]) im Stärkemolekül angenommenen „assoziierten" polymeren Grundkomplexe]. Die eigentliche Depolymerisation ist wohl erst die zweite Reaktion, die die Färbbarkeit durch Jod zum Verschwinden bringt. Die scharfe Biegung der zweiten liegt um so weiter von der Abszisse entfernt, d. h. sie tritt bei einer Stufe mit um so blasserer Blaufärbung ein, je größer die angewandte Enzymkonzentration ist.

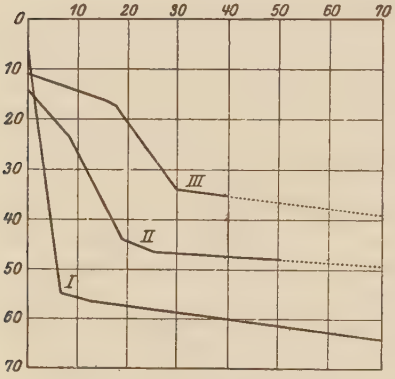

Abb. 2.

Mit Pankreasdiastase erhält man eine ähnliche Kurve bei Verwendung von 0,1 ccm Pankreatin auf 50 ccm einer 1 proz. Amylose-

[1]) *R. Kuhn*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 1965, 1924.
[2]) *H. Pringsheim*, Die Polysaccharide, 2. Aufl. Berlin 1923.

lösung, wenn man alle 2 Minuten eine Probe von 5 ccm mit 1 ccm n/1000 Jodlösung versetzt.

Die Vermutung, die sich bei dem Vergleich der *Kuhn*schen Kurve mit meiner aufdrängt, daß beide Reaktionen, die Maltosebildung und das Verschwinden der Jodfärbbarkeit, eng miteinander zusammenhängen möchten, läßt sich durch weitere Schlüsse bestätigen: *Kuhn* teilt die Amylasen in α- und β-Amylasen ein (nach der primären Form der durch sie entstehenden Maltose). Malzdiastase spaltet nur die β-Bindungen der Stärkegrundkomplexe, Pilz- und Pankreasdiastase nur deren α-Bindungen. Pilz- und Pankreasdiastase spalten aber keine α-glucosidischen Bindungen im üblichen Sinne des Wortes, sonst könnte das Endprodukt ihres Stärkeabbaus nicht Maltose, eine α-Glucosido-Glucose[1]), sein. Ebensowenig spaltet Malzdiastase β-glucosidische Bindungen, wie ich durch Versuche mit Lactose (β-Galactosido-Glucose) bestätigen konnte[2]). Die Resistenz der Maltose und Lactose gegen die α- bzw. β-Amylasen läßt sich nur mit Hilfe der Annahme verstehen, daß die Bindungen im Stärkemolekül, an die diese angepaßt sind, andersartig sind und anders gespalten werden als glucosidische Bindungen. Da sie sterisch wie diese α- und β-Formen darstellen, so kann der Unterschied nur in der Valenzverteilung liegen. Auch *Pringsheim* sagte kürzlich, die Bindung der Amylobiose könne sterisch eine β-glucosidische sein, obwohl sie durch Emulsin nicht angegriffen wird. Vermutlich hängt die Eigenart dieser Bindungen von den besonderen Sauerstoffringen der Di- und Trisaccharide ab, denen sie angehören.

Von diesen Sauerstoffringen bzw. den durch sie bedingten Affinitätsresten hängt nach *Bergmann* und *Ludewig*[3]) auch die Aufnahmefähigkeit für Jod ab. Das legt den Schluß nahe: die Verzuckerung der Amylose und die Zerstörung ihrer Jodfärbbarkeit sind eine und dieselbe Reaktion oder sind wenigstens voneinander abhängig.

Man könnte einwenden, daß die durch Jod färbbaren Polyamylosen, die durch Bac. macerans gebildet werden, resistent gegen Diastase sind. Meines Erachtens sind diese aber keine unveränderten Stärkeabbauprodukte, sondern verdanken ihre Entstehung einer geringfügigen Umlagerung solcher Produkte. Sie müßten sonst durch Diastase gespalten werden, besonders aber durch den Bacillus macerans selbst vergoren werden, durch den sie entstehen.

---

[1]) Nach der Nomenklatur von *H. Pringsheim*.

[2]) *Emil Fischer* hat allerdings einmal die Vermutung ausgesprochen, Aspergillusdiastase und -trehalase seien identisch, aber er bekam auch durch Malzdiastase (nicht durch Ptyalin) eine Spaltung der Trehalose (α-Glucosido-α-Glucosid). Ber. d. deutsch. chem. Ges. **28**, 1429, 1895.

[3]) *M. Bergmann* und *St. Ludewig*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 961, 1924.

Das Verschwinden der Aufnahmefähigkeit für Jod ist unabhängig von der zuerst auftretenden Form der Maltose, wie folgende Übersicht zeigt.

Enzym	Jodfärbung des Dextrins	Primäre Maltoseform
Malzdiastase	hellblau	β[1])
Pankreasdiastase	hellblau	α[1])
Emulsin	hellblau	nur β möglich
Pilzdiastase	rot	α[1])
Bakteriendiastase	rot	—
Ptyalin	je nach der Jodkonzentration rot oder hellblau	—

Darin liegt aber keine Schwierigkeit für die Annahme des engen Zusammenhangs zwischen dem Verschwinden der Jodfärbbarkeit und der Maltosebildung. Es ist ganz gut denkbar, daß die Möglichkeit der Färbung mit Jod aufgehoben wird, sobald die Öffnung des Ringzuckers überhaupt irgendwo erfolgt.

Das Zustandekommen der Rotfärbung auf dem anderen Abbauwege, der ja zu demselben Endprodukt führt, ist vielleicht so zu erklären: Der Faktor, der im Amylosemolekül die blaue Jodreaktion bedingt, ist in der Erythrodextrin-Abbaustufe nicht mehr vorhanden; ein zweiter Faktor, der die rote Färbung ermöglicht, ist aber noch da; er verschwindet erst beim Übergang zum Achroodextrin. Vielleicht erfolgt bei diesem Abbautypus die Depolymerisation ohne gleichzeitige Öffnung des Ringzuckers. Das Dihexosan soll sich ja auch nach *Pringsheim*[2]) mit Jodlösung burgunderrot färben. Bei der Einwirkung des Ptyalins auf Amylose scheinen beide Abbauarten nebeneinander zu verlaufen.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wird es notwendig sein, die Verhältnisse beim Amylopektin zum Vergleich heranzuziehen. Darüber kann ich zurzeit nur folgendes sagen: Der Abbau des Amylopektins durch diastatische Fermente erfolgt viel langsamer als der der Amylose. Die Jodreaktion der Zwischenstufen beim Abbau mit Malz- und Pankreasdiastase ist in derselben Weise von der Jodkonzentration abhängig wie beim Amyloseabbau mit Ptyalin. Bei Verwendung einigermaßen starker Jodmengen bekam ich die Farbleiter: blau, violett, rot, bräunlich; mit sehr schwachen Jodmengen hingegen ergab sich nur blaue Farbe in abnehmender Intensität. Hier scheinen auch bei der Skala der verschiedenen Farben die Abbaustufen dieselbe Beziehung zum Ausgangsmaterial zu haben wie bei der Amylose. Auch hier scheint die veränderte Färbung nur auf einer Konzentrationsverminderung der färbbaren Substanz zu beruhen; die Lösung des Amylopektins (das ich nach der Ausfriermethode von *Ling* und *Nanji*[3]) dargestellt hatte) färbt sich bei Jodzusatz zunächst blau; verdünnt man sie aber sehr stark und setzt verhältnismäßig viel Jod zu, so bekommt man eine Violettfärbung, bei noch weiterer Verdünnung des Amylopektins

[1]) Nach *Kuhn*, l. c.

[2]) *H. Pringsheim* und *K. Wolfsohn*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 887, 1924.

[3]) l. c.

und noch weiterer Steigerung der Jodkonzentration entsteht unter gewissen Umständen eine Rotfärbung. Die Farbe hängt von dem Verhältnis der Jodkonzentration zur Amylopektinkonzentration ab.

Es ist demnach nicht notwendig, das Erythrodextrin als ein besonderes chemisches Individuum anzusprechen. Die Argumente, die *Biltz*[1]) für diese Annahme ins Feld führt, scheinen mir nicht beweiskräftig zu sein; er fand für die Viskosität und damit die Molekulargröße des sogenannten Erythrodextrins Werte, die zwischen denen des Amylodextrins und denen des Achroodextrins liegen. Meiner Meinung nach würde man bei den Mittelgliedern des Amyloseabbaus mit Malz, die mit keiner Jodkonzentration rot zu färben sind, ähnliche Werte finden, ja auch bei einem künstlichen Gemisch aus Amylodextrin und Achroodextrin muß das der Fall sein[2]).

Jedenfalls sind manche bisher herrschenden Unklarheiten über die mit Jod färbbaren Stufen des Stärkeabbaus dadurch aufzuhellen, daß man die beiden Teilreaktionen dieses bisher als einheitlich betrachteten Vorgangs, den Abbau der Amylose und des Amylopektins, gesondert verfolgt. Die Angaben über reduzierende Amylo- und Erythrodextrine sowie der Befund von *Biltz*[3]), daß die Verzuckerungsgeschwindigkeit beim Amylodextrin am größten, beim Achroodextrin am kleinsten sei, liegen wahrscheinlich an der Übereinanderlagerung der beiden mit verschiedener Geschwindigkeit verlaufenden Reaktionen.

Es bestätigt sich hier der von *Emil Fischer* mehrfach ausgesprochene Gedanke, daß das Studium der enzymatischen Prozesse berufen sei, die Anschauungen über den molekularen Bau komplizierter Kohlenstoffverbindungen zu vertiefen. Ich konnte meine Anschauungen nicht in allen Punkten experimentell beweisen, ich glaube aber, daß sie gegenwärtig die beste Möglichkeit zur Erklärung der beobachteten Tatsachen darstellen.

Zusammenfassung.

Zum Schluß möchte ich die gewonnenen Resultate kurz zusammenfassen.

Das mit Jod blau reagierende Polysaccharid bei Aspergillus niger v. Tgh. ist mit Amylose identisch. Glykogen ist dagegen im Gegensatz zu der Angabe von *Waterman*, auch wenn keine Amylose gebildet wird, in makrochemisch faßbaren Mengen nicht nachzuweisen. Es ist bemerkenswert, daß bei Mikroorganismen die beiden Bestandteile der Stärke der höheren Pflanzen — das Amylopektin und die Amylose —

---

[1]) *W. Biltz*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **46**, 1532.
[2]) Vgl. Biochem. Handlexikon **2**, 164. Berlin 1911.
[3]) l. c.

jedes allein auftreten, wie von dem Amylopektin [Glykogen[1])] schon lange bekannt ist. Die Amylose hatte *Pringsheim*[2]) als Isolichenin in Flechten gefunden; doch handelte es sich hier ja um eine Symbiose eines Pilzes mit grünen Algen, was eine unmittelbare Beteiligung photosynthetischer Vorgänge bei der Bildung der Amylose nicht unbedingt ausschließt, die bei Aspergillus natürlich nicht in Frage kommt.

Ergänzende Versuche über die Bedingungen der Pilzstärkebildung zeigten, daß sie in einigen bisher noch nicht daraufhin untersuchten Fällen in derselben Weise mit der Säurebildung parallel geht, wie es in anderen schon *Boas* fand. Doch scheint auch das Stickstoff-Kohlehydratverhältnis von Einfluß zu sein, indem bei Ausschluß von solchen Fällen, in denen anorganische Säure frei wird, die Bildung von Pilzstärke mit dem Sinken der Stickstoff- gegenüber der Kohlehydraternährung zunimmt. Andererseits zeigten Versuche bei verschiedener Temperatur, daß auch noch weitere, bisher unbekannte Faktoren beteiligt sein müssen.

Als Vorstufe der Pilzstärkebildung kommt vielleicht das Paradextran (Fungose) in Betracht. An der Umwandlung der Vorstufe ist ein Enzym beteiligt.

Der Abbau der Amylose durch Säuren und verschiedene Enzyme geht auf zwei verschiedenen Wegen vor sich, indem einerseits (Säure-, Pilz- und Bakteriendiastase) sich durch Jod rot färbende Abbaustufen auftreten, andererseits (Malz- und Pankreasdiastase, Emulsin) lediglich eine abnehmende Bläuung durch Jod zu beobachten ist. Dieses Verschwinden der Jodfärbbarkeit hängt wahrscheinlich mit der Maltosebildung direkt zusammen.

Es ist möglich, daß eine genauere Untersuchung dieser Verhältnisse neue Einblicke in die Chemie der Stärke und ihres Abbaus gewähren wird.

---

[1]) Vgl. *H. Pringsheim*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 1581, 1924.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst. Man vergleiche dazu die Bemerkungen oben S. 246 im Anschluß an die Feststellungen von *Karrer-Joos*.

Lebenslauf

Am 4. November 1899 wurde ich in Elberfeld geboren als Tochter des jetzt in Freiburg i. B. lebenden Studienrats Prof. Hermann Schmidt und seiner Ehefrau Wanda geb. Hildebrandt. Ich bin evangelischer Konfession. Seit meiner Geburt besitze ich die preußische, seit 1922 außerdem die badische Staatsangehörigkeit. Von Ostern 1906 bis Herbst 1913 besuchte ich das Lyzeum-Ost in Elberfeld, von Ostern 1914 ab die realgymnasiale Studienanstalt in Barmen, wo ich Ostern 1919 die Reifeprüfung ablegte. Im Winter-Semester 1920 studierte ich in Göttingen, von Ostern 1920 bis Ostern 1923 in Freiburg i. B., von dieser Zeit ab wieder in Göttingen. Im Juli 1922 betand ich in Freiburg das erste chemische Verbandsexamen. Meine Hochschullehrer waren

in Freiburg: Baltzer, Freudenberg, Fromm, Himstedt, Kiliani, Knoop, Lecher, Meyer, Noack, Oltmanns, Rawitscher, Schwarz, Skita, Spemann, Wieland;

in Göttingen: Berthold, Burgeff, Dürken, Kötz, Peter, Reichenbach, Rippel, Wienhaus, Windaus.

Allen meinen Lehrern, besonders Herrn Professor Rippel, bin ich zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Dorothea Schmidt.